

Dissertação de Mestrado

**ANÁLISE DO PADRÃO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA
POR MEMBRANAS DE ÁCIDO POLILÁTICO CO-GLICÓLICO
(PLGA) ASSOCIADO OU NÃO À HIDROXIAPATITA
(PLGA+HA) EM DEFEITOS ÓSSEOS NA CALOTA CRANIANA
DE RATOS**

Artur Breno Wanderley Alécio



Universidade Federal de Santa Catarina

Programa de Pós-graduação em Odontologia

Artur Breno Wanderley Alécio

**ANÁLISE DO PADRÃO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA
POR MEMBRANAS DE ÁCIDO POLILÁTICO CO-GLICÓLICO
(PLGA) ASSOCIADO OU NÃO À HIDROXIAPATITA
(PLGA+HA) EM DEFEITOS ÓSSEOS NA CALOTA CRANIANA
DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia
Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Alécio, Artur Breno Wanderley
ANÁLISE DO PADRÃO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR
MEMBRANAS DE ÁCIDO POLILÁTICO CO-GLICÓLICO (PLGA)
ASSOCIADO OU NÃO À HIDROXIAPATITA (PLGA+HA) EM DEFEITOS
ÓSSEOS NA CALOTA CRANIANA DE RATOS / Artur Breno
Wanderley Alécio ; orientador, Ricardo De Souza Magini -
Florianópolis, SC, 2014.

102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Regeneração óssea guiada. 3.
Membranas. 4. Polímeros. 5. Hidroxiapatita. I. Magini,
Ricardo De Souza . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III.
Título.

ANÁLISE DO PADRÃO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR MEMBRANAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO CO- GLICÓLICO (PLGA) ASSOCIADO OU NÃO À HIDROXIAPATITA (PLGA+HA) EM DEFEITOS ÓSSEOS NA CALOTA CRANIANA DE RATOS

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de MESTRE EM ODONTOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA e aprovada em sua forma final pelo programa de pós-graduação em Odontologia

Florianópolis, 26 de Fevereiro de 2014.

Prof.ª. Dra. Izabel Cristina Santos de Almeida
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador

Prof. Dr. Aguedo Aragones
Membro

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti
Membro

Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini
Membro

Prof. Dr. Andrea de Lima Pimenta
Suplente

DEDICATÓRIA

Ao meu avô Artur, o grande mestre e melhor amigo que tive nesta vida, por ter me mostrado o valor do amor à família. Sem ele esse sonho não seria possível. Agradeço a Deus por ter colocado esta pessoa em minha vida. Busco a cada dia tornar-me o homem que ele foi enquanto esteve conosco.

AGRADECIMENTOS

Serei eternamente grato a **Deus**, por seu amor, por sempre me fortalecer e dessa forma me tornar capaz de realizar todos os sonhos. Por permitir a conclusão de mais uma etapa tão importante em minha vida.

Aos meus pais, **José Albérico e Roberta**, pelo amor incondicional, por sempre me apoiarem em tudo, por abrirem mão de tanto, inclusive da convivência comigo, a fim de verem a felicidade do seu filho em realizar um sonho.

Aos meus irmãos: **Alexandre**, pela constante torcida por mim e pela presença em todos os momentos; **Clarissa (em memória)**, verdadeiramente um anjo que Deus enviou, com quem tive o prazer de conviver e aprender o verdadeiro sentido da felicidade acima de qualquer dificuldade; **Pedro e Davi**, que com a inocência da criança sempre me enchem de alegria. Meus irmãos, vocês são minha inspiração e força.

À minha avó, **Alice**, pelas orações e por esse amor de avó que faz tão bem.

À minha namorada, **Aline**, pelo amor e companheirismo em todos os momentos, por suportar a distância e manter-se forte ao meu lado. Você é meu exemplo e com certeza essa conquista também é sua.

A toda a minha família, em especial meus tios, **Gilma, Maria de Lourdes, Ana, Cristina e Gerson** pelos conselhos e orações constantes.

Ao **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, por me mostrar, por meio de suas atitudes, que devo sempre buscar a excelência e que somos capazes de ser o que quisermos. Obrigado pela confiança depositada.

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini**, por todo conhecimento transmitido durante o mestrado, principalmente em relação à pesquisa clínica. Sua personalidade marcante certamente me influenciou muito positivamente.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**, por estar sempre disposto a ajudar, por compartilhar da sua grande sabedoria, por estimular e aguçar o sentido crítico, mostrando que nem tudo pode ser tomado como verdade absoluta. Cresci e aprendi muito durante a nossa convivência.

Ao **Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti**, pelos excelentes ensinamentos durante os procedimentos cirúrgicos e seminários, pela sua disposição em ajudar sempre que solicitado.

Ao **Prof. Dr. Aguedo Aragones**, pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho, pela ajuda em todos os momentos.

À colega do doutorado, **Isis Encarnação**, por abrir mão de dias que poderiam ser de descanso para trabalhar neste experimento. Seu apoio, paciência e disposição para a realização deste estudo foram fundamentais. Sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

À aluna da graduação, **Suzeli Dias**, por se mostrar disposta a ajudar em todos os momentos da pesquisa em que foi solicitada.

Aos dois irmãos que ganhei durante esse tempo em Florianópolis, **Bernardo e José Daniel**, amigos para toda a vida, obrigado pela contribuição de vocês na pesquisa, na minha vida pessoal e profissional.

Aos colegas de mestrado, os contemporâneos **Luiz, Haline, Mariela e Juliana**, e os novos **Carol, Abraão, Maurício, Juan, Letícia e Gabriela**, por compartilharem conhecimento e amizade. Muito pude aprender e crescer com vocês durante esse tempo.

Aos colegas do doutorado, **João, Armando, Clessius, Cintia, Guinther, Ivan, Maria, Camilo, Carol e José**, por sempre mostrarem-se solícitos e compartilharem suas experiências. Dessa forma as dificuldades do mestrado foram mais brandas.

Às secretárias, do CEPID, **Silvane e Mirian**, e da pós-graduação, **Ana Maria**, pela paciência e atenção prestadas.

"Todas as coisas são possíveis àquele que crê."

Marcos 9:23

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Comparação dos valores da escala de cinza entre os grupos PLGA (8 amostras); PLGA+HA (8 amostras) e SHAM (10 amostras) no período experimental de 07 dias pós-operatório. Diferença estatística encontrada a favor do grupo PLGA+HA em relação ao grupo SHAM.

Gráfico 2- Comparação dos valores da escala de cinza entre os grupos PLGA (9 amostras); PLGA+HA (9 amostras) e SHAM (9 amostras) no período experimental de 15 dias pós-operatório. Diferença estatística encontrada a favor do grupo PLGA+HA em relação ao grupo SHAM.

Gráfico 3- Comparação dos valores da escala de cinza entre os grupos PLGA (9 amostras); PLGA+HA (7 amostras) e SHAM (10 amostras) no período experimental de 30 dias pós-operatório. Não houve diferença estatística entre os três grupos.

Gráfico 4- Comparação dos valores da escala de cinza entre os grupos PLGA (6 amostras); PLGA+HA (11 amostras) e SHAM (7 amostras) no período experimental de 60 dias pós-operatório. Não houve diferença estatística entre os três grupos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Radiografia digital da amostra (grupo *sham*). Período experimental de 30 dias pós-operatório.

Figura 2- Amostras colhidas no período experimental de 07 dias pós-operatório. Grupos controle (lado esquerdo) e PLGA+HA (lado direito). Observar a presença do coágulo na amostra de PLGA+HA.

Figura 3- Mesa para estereotaxia.

Figura 4- Área operatória preparada assepticamente.

Figura 5-Incisão cutânea.

Figura 6- Divulsão dos tecidos.

Figura 7- Incisão do periósteo.

Figura 8- Defeitos realizados nos ossos parietais com trefina de 5mm de diâmetro.

Figura 9- Tecidos ósseos internos à trefina removidos.

Figura 10- Membranas de PLGA (esquerda) e PLGA+HA (direita) posicionadas sobre os defeitos.

Figura 11- Periósteo suturado estabilizando as membranas.

Figura 12- Sutura do tecido cutâneo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

< - Menor

+ - Mais

- - Menos

% - Por cento

ChCl3- Clorofórmio

cm- Centímetro

e-PTFE- Politetrafluoretileno expandido

g- Grama

h- Hora

HA- hidroxiapatita e β -Trifosfato de Cálcio na Proporção 70% - 30% respectivamente

kg– Quilograma(s)

Kvp- Quilovolts

m- Massa

mA- Miliampère

mg- Miligrama(s)

mm- Milímetro (s)

p- Valor de P

pH- Potencial hidrogênico

PLA- Ácido polilático

PLLA- Ácido poli L-lático

PLGA- Ácido polilático co-glicólico

PLGA+HA – Ácido polilático co-glicólico associado a hidroxiapatita + β -Trifosfato de Cálcio na Proporção 70% - 30% respectivamente

PGA- Ácido poliglicólico

s - Segundos

Sham- Controle negativo

v - Volume

°C– Graus Celsius

µm -Micrometro(s)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	23
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	27
CAPÍTULO II	29
INTRODUÇÃO EXTENDIDA.....	31
OBJETIVOS.....	35
CAPÍTULO III.....	37
ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	39
RESUMO.....	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	57
FIGURAS.....	61
GRÁFICOS.....	63
CAPÍTULO IV	67
REFERÊNCIAS CONSULTADAS.....	69
CAPÍTULO V	79
APÊNDICE.....	81
FIGURAS DA METODOLOGIA.....	81
ANEXOS.....	87
ANEXO A - APROVAÇÃO CEUA.....	87
ANEXO B – NORMAS DO PERIÓDICO.....	88

CAPÍTULO I

RESUMO

Objetivo: Avaliar, *in vivo*, o reparo ósseo no uso de membranas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) associado ou não à hidroxiapatita (HA) na regeneração óssea.

Materiais e métodos: Foram utilizados 53 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos machos (20 – 24 semanas) pesando aproximadamente 180g. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: Sham, grupo controle, no qual foram realizados os defeitos ósseos sem recobrimento com membrana; PLGA e PLGA+HA, grupos nos quais os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de PLGA e PLGA+HA, respectivamente. Foi confeccionado um defeito circular de 5 mm de diâmetro em cada osso parietal e tratado aleatoriamente de acordo com os grupos propostos. As amostras foram colhidas nos períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios e processadas para análise da densitometria óssea de imagens radiográficas, verificando assim a mineralização da matriz óssea e consequentemente o reparo.

Resultados: Diferença estatisticamente significativa foi encontrada a favor do grupo PLGA+HA em relação ao SHAM nos dois primeiros períodos experimentais.

Conclusão: Membranas de PLGA associadas à hidroxiapatita parecem acelerar o reparo ósseo em suas fases iniciais.

PALAVRAS-CHAVE: Reparo ósseo; Membranas; Hidroxiapatita; Polímeros.

ABSTRACT

Objective: To evaluate *in vivo* the bone repair in the use of poly lactic acid co-glycolic (PLGA) membranes associated or not with hydroxyapatite (HA) on the bone regeneration.

Materials and methods: 53 rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adult males (20-24 weeks) weighing approximately 180g were used. The animals were shared in 3 groups : Sham control group, in which the bone defects were performed without membranes; PLGA and PLGA+HA groups in which the bone defects were covered with a PLGA and PLGA+HA membranes, respectively. The defect was created with a 5 mm diameter trephine burn on each parietal bone and treated randomly according to the groups proposed. The samples were collected in the experimental periods of 7, 15, 30 and 60 days post-surgery and processed for bone densitometry analysis in order to evaluate the bone repair.

Results: Statistically significant difference was found in the PLGA+HA group when compared with SHAM group in the first two experimental periods.

Conclusion: PLGA membranes associated with hydroxyapatite seem to accelerate bone repair in its early stages.

KEY-WORDS: Bone repair; Membranes; Hydroxyapatite; Polymers .

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO EXTENDIDA

Em um planejamento reabilitador com implantes osseointegrados, nem sempre no local onde se deseja instalar o implante existe quantidade óssea suficiente, seja por reabsorção fisiológica ou trauma na região (CHIAPASCO *et al.*, 2009). Desta forma, procedimentos regenerativos são utilizados com o objetivo de ganhar tecido ósseo e proporcionar ao profissional a instalação do implante em uma região anatomicamente favorável (BUSER *et al.*, 1996).

O tecido ósseo tem um padrão de crescimento que demanda um tempo maior para a sua formação quando comparado ao tecido conjuntivo não mineralizado, já que os fibroblastos proliferam e produzem matriz de colágeno mais rapidamente que os osteoblastos para formar o tecido ósseo (MELCHER 1976). Por isso a migração celular seletiva se faz necessária na regeneração óssea, excluindo as células do tecido mole do sítio em cicatrização (NYLMAN *et al.*, 1982). Desta forma, o uso de membranas como barreira tecidual evita a invasão de fibroblastos e consequentemente favorece o crescimento de tecido ósseo na região em que este deve estar presente. (DAHLIN *et al.*, 1988; SALONEN & PERSSON 1990)

Dentre as características básicas de uma membrana utilizada como barreira, podemos citar: capacidade de formação e manutenção do espaço para possibilitar um volume estável no período de reparo, oclusão celular, permitindo assim a migração celular seletiva; integração tecidual que está diretamente relacionada a topografia, porosidade e química da superfície da membrana, determinando se ocorrerá invaginação ou adesão superficial do tecido durante o reparo; e biocompatibilidade, que é a capacidade do material em desempenhar sua função específica, sem causar reações adversas locais e sistêmicas por parte do hospedeiro, bem como a liberação de produtos finais inertes. (KARRING *et al.*, 1993; IGNATIUS & CLAES 1996). Além disso, a facilidade no manejo clínico das membranas durante os procedimentos cirúrgicos deve ser avaliada na escolha do material a ser utilizado (DAHLIN *et al.*, 1990).

Existem dois tipos básicos de membranas que podem ser utilizadas nos procedimentos de regeneração óssea guiada: as

absorvíveis e as não absorvíveis. As membranas podem ainda ser classificadas de acordo com o tipo de material utilizado: sintético, derivadas dos polímeros ou de origem animal.

As membranas de colágeno disponíveis são do tipo absorvíveis e geradas a partir do colágeno tipo I, um componente predominante no tecido conjuntivo, ou de uma combinação de colágenos tipo II e III. As fontes de colágeno são variadas e incluem tendão bovino, derme bovina, pele de ovinos ou derme de suínos (BUNYARATAVEJ & WANG 2001). Dentre as vantagens das membranas de colágeno podemos citar: hemostasia, baixa imunogenicidade, fácil manipulação e efeito direto na formação óssea. Entretanto, possuem propriedades mecânicas desfavoráveis e não funcionam de forma totalmente adequada como barreira devido à sua rápida biodegradação pelas atividades enzimáticas dos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (ROTHAMEL *et al.*, 2004; SCHLEGEL *et al.*, 1997; LOCCI *et al.*, 1997).

As membranas derivadas de polímeros podem ser classificadas em absorvíveis, quando produzidas a partir dos ácidos polilático (PLA) e poliglicólico (PGA), e não absorvíveis quando produzida em politetrafluoretileno expandido ou não. O ácido poliglicólico exibe boas propriedades mecânicas e seu principal uso é como material de suporte. O ácido poli L-lático (PLLA) derivado do ácido lático possui alta resistência, comportamento termoplástico, biocompatibilidade e sensibilidade à água, visto que degrada-se lentamente, quando comparado aos polímeros solúveis que aumentam de volume na água. O ácido polilático co-glicólico (PLGA), uma combinação do ácido polilático e poliglicólico, requer um menor tempo para sua completa degradação e sua estrutura química é menos suscetível à reação de hidrólise, pois possui um impedimento menor ao ataque das moléculas de água (TATAKIS *et al.*, 2000). A combinação de polímeros permite melhorar as propriedades físicas e químicas, o que não é observado nos polímeros individualmente. Assim a combinação mostra-se como uma boa alternativa para a obtenção de um material com as propriedades desejadas.

As membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) são consideradas o padrão ouro para regeneração óssea (TRIPLETT *et al.*, 2001). Porém, o fato destas membranas não serem absorvíveis

faz com que o tratamento seja mais traumático, visto que torna-se necessário um segundo tempo cirúrgico para a remoção da mesma. Além disso, é comum deiscência da sutura e posterior infecção na região em que se deseja o reparo (SIMOM *et al.*, 1999). Assim, estudos utilizando novos materiais absorvíveis estão sendo desenvolvidos para alcançar resultados semelhantes ou melhores do que encontrados com as membranas não absorvíveis (PETITE *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2012).

Um fator importante na confecção das membranas é o controle do tamanho dos poros, o que permite usá-los como um parâmetro importante para ser aplicado na bioengenharia tecidual. A macroporosidade com presença de microporos interconectados contribui tanto para penetração dos fluidos quanto para a biodegradação das membranas (LANSMAN *et al.*, 2006; GÓMEZ *et al.*, 2006).

Pesquisas têm sido conduzidas avaliando a longo prazo a estabilidade de implantes instalados em locais submetidos a regeneração óssea utilizando diversos tipos de membranas. Em todos os casos a estabilidade dos implantes não foi influenciada pela regeneração ou tipo de membrana utilizada quando comparado com implantes instalados em osso nativo (ZITZMANN *et al.*, 2001; BUSER *et al.*, 2008; BENÍĆ *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2012). Porém, a quantidade de tecido ósseo formado nas regiões regeneradas também pode ser influenciada pelo tipo de membrana utilizada (SIMION *et al.*, 1999; PETITE *et al.*, 1999). Logo, a busca pelo melhoramento dos biomateriais deve ser contínua, objetivando a formação de um tecido mineralizado com os melhores resultados possíveis.

Recentemente vários biomateriais têm sido incorporados às membranas de PLGA com o objetivo de melhorar as propriedades físicas e químicas, sendo exemplos o colágeno, a quitosana, sivastatina e o cálcio fosfato (CHEN *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2011). Da mesma forma, antibióticos como a tetraciclina podem ser adicionados às membranas, de acordo com a finalidade desejada. Assim, a droga pode ser liberada lenta e diretamente sobre o tecido o qual se deseja regenerar (OWEN *et al.*, 2010).

A hidroxiapatita (HA) é o constituinte mineral do osso natural, representando 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (DORAJAN *et al.*, 2005). A hidroxiapatita sintética é uma cerâmica biocompatível que tem afinidade com o tecido ósseo, o que favorece a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, além de possuir propriedades de osseointegração, e recentemente, tem sido incorporada às membranas com a finalidade de acelerar o reparo ósseo (Sui G, *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2013). A porosidade dos materiais facilita a proliferação do tecido ósseo (Ohgushiet *et al.*, 1990; Ishihara *et al.*, 1992), porém diminui a resistência do material (Lopes *et al.*, 1999). Estudos associando tanto membranas PLLA quanto arcabouços de PLGA à hidroxiapatita mostraram resultados promissores em relação ao melhoramento das propriedades físicas e químicas destes biomateriais (Sui *et al.*, 1997; Messias *et al.*, 2008). Desta forma, a associação entre um material resistente como o PLGA, na forma de membrana, com outro que possui afinidade com os tecidos (HA), pode melhorar e acelerar reparo ósseo e, conseqüentemente, o tratamento de pacientes com necessidades de ganho ósseo.

OBJETIVOS

1. Geral

Avaliar *in vivo* o reparo ósseo utilizando membranas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) associado ou não à hidroxiapatita (HA).

2. Específico

Avaliar comparativamente, por meio de densitometria óssea visualizada por radiografias, a mineralização óssea presente nos períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório.

CAPÍTULO III

ARTIGO EM PORTUGUÊS

O Artigo abaixo foi formatado de acordo com as normas para elaboração de artigos do periódico *Clinical Oral Implants Research*.
(Anexo B)

ANÁLISE DO PADRÃO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR MEMBRANAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO CO-GLICÓLICO (PLGA) ASSOCIADO OU NÃO À HIDROXIAPATITA (PLGA+HA) EM DEFEITOS ÓSSEOS NA CALOTA CRANIANA DE RATOS.

Artur Breno Wanderley Alécio* Isis Carvalho Encarnação** Águedo Aragonés*** César Augusto Magalhães Benfatti**** Ricardo de Souza Magini*****

* Mestrando em Implantodontia- Universidade Federal de Santa Catarina– UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.

**Mestrado em Implantodontia e Doutoranda em Implantodontia- Universidade Federal de Santa Catarina– UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.

***Pós-doutorando em Implantodontia na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.

**** Doutor em Odontologia/Implantodontia – Professor adjunto I na Universidade Federal de Santa Catarina– UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.

*****Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.

Título Reduzido: REGENERAÇÃO ÓSSEA COM MEMBRANAS DE PLGA+HA

Autor correspondente:

Artur Breno Wanderley Alécio

Tel.: +55 (82)8888-4986 - e-mail: arturbrenow@gmail.com

Endereço: Campus universitário, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Palavras-chave: Reparo ósseo; Membranas; Hidroxiapatita; Polímeros.

RESUMO

Objetivo: Avaliar, *in vivo*, o reparo ósseo promovido por membranas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) associado ou não à hidroxiapatita (HA) na regeneração óssea.

Materias e métodos: Foram utilizados 53 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos machos (20 – 24 semanas) pesando aproximadamente 180g. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: *Sham*, grupo controle, no qual foram realizados os defeitos ósseos sem recobrimento com membrana; PLGA e PLGA+HA, grupos nos quais os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de PLGA e PLGA+HA, respectivamente. Foi confeccionado um defeito circular de 5 mm de diâmetro em cada osso parietal e tratado aleatoriamente de acordo com os grupos propostos. As amostras foram colhidas nos períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios e processadas para análise da densitometria óssea de imagens radiográficas.

Resultados: Diferença estatisticamente significativa foi encontrada a favor do grupo PLGA+HA em relação ao controle nos dois primeiros períodos experimentais.

Conclusão: Membranas de PLGA associadas à hidroxiapatita parecem acelerar o reparo ósseo em suas fases iniciais.

INTRODUÇÃO

Em um planejamento reabilitador com implantes osseointegrados, nem sempre no local onde se deseja instalar o implante existe quantidade óssea suficiente, seja por reabsorção fisiológica ou trauma na região (Chiapasco *et al.*, 2009). Desta forma, procedimentos regenerativos são utilizados com o objetivo de ganhar tecido ósseo e proporcionar ao profissional a viabilidade de instalar o implante em uma região anatomicamente favorável (Buser *et al.*, 1996).

O tecido ósseo tem um padrão de crescimento que demanda um tempo maior para a sua formação quando comparado com os tecidos moles, já que os fibroblastos proliferam e produzem matriz de colágeno mais rapidamente que os osteoblastos para formar o tecido ósseo (Melcher 1976). Desta forma, a utilização de membranas como barreira para os tecidos moles, favorecerem o crescimento de tecido ósseo na região em que este deve estar presente (Dahlin *et al.*, 1988; Salonen & Persson 1990).

As membranas derivadas de polímeros são amplamente utilizadas tanto na periodontia quanto na implantodontia e podem ser classificadas em absorvíveis, quando produzidas a partir dos ácidos polilático e poliglicólico, e não absorvíveis quando produzida em politetrafluoretileno expandido. Devido a necessidade de uma segunda etapa cirúrgica e o risco de infecção quando expostas ao meio bucal, existe uma tendência maior à utilização de membranas absorvíveis (OH *et al.*, 2003).

O ácido polilático co-glicólico (PLGA) uma combinação do ácido polilático (PLA) e poliglicólico (PGA), requer um menor tempo para sua completa degradação. Sua estrutura química é mais suscetível à reação de hidrólise pois possui um impedimento menor ao ataque das moléculas de água permitindo o melhoramento das suas propriedades físicas e químicas (Tatakis *et al.*, 2000). Além disso, vários materiais têm sido incorporados às membranas utilizadas como barreiras, visando acelerar o reparo ósseo (Owen *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2011).

A hidroxiapatita sintética é uma cerâmica biocompatível que tem afinidade com o tecido ósseo, favorecendo a proliferação de

fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, além de possuir propriedades de osseointegração e recentemente tem sido incorporada às membranas com a finalidade de acelerar o reparo ósseo (Sui G, *et al.*, 2007; Hao et al., 2013). A porosidade do material facilita a proliferação do tecido ósseo (Ohgushi *et al.*, 1990; Ishihara *et al.*, 1992). Porém, diminui sua resistência (Lopes *et al.*, 1999). Desta forma, a associação entre um material resistente como o PLGA com outro que possui afinidade com os tecidos (hidroxiapatita), pode melhorar e acelerar o reparo ósseo e, conseqüentemente, o tratamento de pacientes com necessidades de ganho ósseo. O objetivo deste estudo é avaliar, *in vivo*, através da radiopacidade visualizada por radiografias, o reparo ósseo de membranas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) associado ou não à hidroxiapatita (HA).

MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, sob protocolo PP00831.

Foram utilizados 53 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos machos (20 – 24 semanas) pesando aproximadamente 180g. Os animais foram distribuídos em três grupos: *Sham*, grupo controle, no qual foram realizados os defeitos ósseos sem recobrimento com membrana; PLGA e PLGA+HA, grupos nos quais os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de PLGA e PLGA+HA, respectivamente. Em cada animal foi realizado um defeito circular de 5mm de diâmetro em cada osso parietal. Os defeitos foram tratados aleatoriamente de acordo com os grupos propostos, totalizando 106 defeitos. Os tempos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias foram utilizados para avaliar o início e maturação da mineralização óssea. Os animais foram mantidos sob condições similares, em sala com 22°C +/- 2°C, 60% +/- 5% de umidade e em ciclo claro/escuro de 12/12h. Os ratos foram alimentados *ad libitum* com dieta sólida padrão e água. Os experimentos iniciaram-se após um período de 3 dias de aclimação.

Obtenção e preparo das membranas de PLGA+HA

As membranas foram produzidas com copolímero de ácido polilático co-glicólico associado à hidroxiapatita (PLGA+HA), obtidos pela técnica de evaporação de solvente. O copolímero ácido polilático

co-glicólico (PLGA) (Resomer, EvonikInd., Essen - Alemanha), na proporção 82:18 (m:m), foi dissolvido em clorofórmio PA (CHCl_3 – Synth – LabSynth, Diadema, Brasil) (10% m/v) em temperatura ambiente. Após a dissolução completa do polímero, foram adicionadas partículas de 50 μm de hidroxiapatita (30% m/v) (Genphos Genius, Baumer, Mogi Mirim, Brasil). Essa solução foi vertida em moldes. Após a evaporação dosolvente em temperatura ambiente as peças foram recortadas com uma tesoura para obtenção das amostras com dimensões de 15 x 20 x 0,5 mm para recobrimento do defeito ósseo criado na calvária dos ratos. Depois de prontos, foram embalados e submetidos à esterilização com radiação gama.

Intervenção cirúrgica

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de 90 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec, Cotia – São Paulo) e 10 mg/kg cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec, Cotia – São Paulo). A parte dorsal do crânio foi tricotomizada e foi realizada a antisepsia com algodão embebido em solução de iodopovidine (Povidine, Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo), com o animal posicionado sobre a mesa cirúrgica

em decúbito ventral e com a cabeça imobilizada em três pontos fixos com o auxílio de uma mesa para estereotaxia.

Uma incisão cutânea e muscular de 15 a 20 mm de comprimento foi realizada na porção posterior da calvária ao longo da sutura sagital, com auxílio de bisturi e lâmina nº 15 (Swann-Morton® SurgicalBlades, Inglaterra). A pele e o tecido subcutâneo foram refletidos e, em seguida, os tecidos subjacentes divulsionados com o auxílio de uma tesoura pequena com extremidade romba e pinça de dissecação até a exposição do periósteo, que foi incisado permitindo a exposição do osso parietal.

Dois defeitos ósseos foram realizados, um em cada osso parietal, laterais à sutura sagital (lado direito e lado esquerdo). Os defeitos foram realizados com o auxílio de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba - Paraná) montada em um motor cirúrgico (NSK®, Kanumashi - Japão) com contra-ângulo (NSK®, Kanumashi - Japão) apresentando redução de 20:1 e rotação de 700 rpm, sob irrigação constante com solução salina para prevenir o superaquecimento das paredes ósseas. Esse procedimento foi realizado delicadamente para evitar a exposição da dura-máter.

Cada animal, que recebeu dois defeitos ósseos, foi incluído em dois dos três grupos, ou seja, cada defeito foi regenerado de acordo com um dos tipos de tratamento proposto.

O periósteo e o tecido subcutâneo foram reposicionados e suturados com fio de sutura Vicryl 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson Company, SP, Brasil) e o tecido cutâneo com fio Nylon 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson Company, SP, Brasil). Os animais foram monitorados diariamente para observação e tratamento de qualquer intercorrência.

Remoção das amostras

Decorridos 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório, os animais foram anestesiados como detalhado previamente e receberam perfusão de solução salina a 0,9% seguida de solução de formaldeído a 10% (pH 7.4) através da aorta ascendente. O crânio foi dissecado e os ossos parietais foram removidos com os tecidos moles circundantes intactos.

Processamento e análise radiográfica

Para a avaliação radiográfica, foram realizadas radiografias digitais das amostras (Figura 1). Um sensor radiográfico digital (Digora

Optime, Soredex, Alemanha) foi utilizado paralelamente às amostras. As radiografias foram realizadas em equipamento de raios X (Gendex 765DC, Gendex Dental Systems, Inglaterra) sob as seguintes condições: 8mA; 70KVp; distância focal de 30cm; 0,32s de exposição.

A densitometria óssea no local das amostras foi determinada pela análise dos tons de cinza, calculada com o auxílio do *softwareImageJ64* (*NationalInstituteof Health*, Bethesda, MD, USA) que forneceu a média e o desvio padrão dos tons de cinza nessas regiões pré-determinadas por meio da linha de histograma. As imagens foram analisadas duas vezes pelo mesmo observador, previamente calibrado.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise descritiva, média e erro padrão, comparando os grupos em cada período através dos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O nível de significância foi estabelecido como $p<0,05$.

RESULTADOS

Três defeitos foram excluídos da pesquisa, pois, durante o procedimento cirúrgico, houve lesão da dura-máter e posteriormente edema cerebral, que ocupou o espaço do defeito ósseo, impedindo assim a regeneração óssea no local. Clinicamente, no período pós-operatório nenhuma característica clínica de processo inflamatório exacerbado ou infecção foi observada, mesmo em casos de deiscência da sutura.

O grupo PLGA+HA obteve os maiores valores médios de escala de cinza em todos os períodos experimentais quando comparado como grupo PLGA, porém, sem diferença estatística significativa. Na comparação com o grupo *Sham* nos períodos experimentais de 07 e 15 dias, o grupo PLGA+HA apresentou uma diferença estatisticamente significativa a seu favor (Gráficos 1 e 2). Nos períodos de 30 e 60 dias o grupo PLGA+HA obteve escala de cinza maior que o grupo *Sham*, esses valores não foram estatisticamente significantes. (Gráficos 3 e 4) O Grupo PLGA apresentou média maior que o grupo *Sham* nos períodos de 07,15 e 30 dias, todas as diferenças não foram significativas estatisticamente. O grupo *Sham* apresentou maior média apenas na comparação com o grupo PLGA no período de 60 dias, esses resultados também não foram estatisticamente significantes (Gráfico 4).

DISCUSSÃO

Em relação às observações clínicas do experimento, nenhum animal desenvolveu processo infeccioso ou inflamatório exacerbado, mesmo em alguns casos que houve exposição da membrana devido à deiscência da sutura, mostrando a segurança da utilização desse tipo de membrana para regeneração óssea guiada já evidenciada em estudo anterior (Ignatius & Claes 1996). Durante a coleta das amostras no período de 07 dias, observou-se que os defeitos tratados tanto com membranas de PLGA como PLGA+HA, apresentaram uma manutenção do coágulo, fato que não ocorreu com o grupo *Sham* (Figura 2). Desta forma, as membranas foram eficientes em estabilizar o coágulo e protegê-lo da invasão de células do tecido mole adjacente. A manutenção do coágulo é de extrema importância nas fases iniciais do processo de regeneração, pois, possibilita uma maior angiogênese, que está relacionada diretamente com a formação de novo tecido ósseo, além de facilitar a migração de células osteogênicas durante a regeneração óssea (Schmid J *et al.*, 1997).

As membranas devem possuir algumas características básicas para que possam ser utilizadas como barreiras durante o processo de regeneração

óssea guiada. As mesmas necessitam apresentar: biocompatibilidade, propriedades oclusivas, capacidade de criação de espaço, integração tecidual e ser clinicamente manuseáveis (Dahlin *et al.*,1990; Karring *et al.*,1993; Buser *et al.*,1996). Uma das principais vantagens da utilização das membranas de PLGA está no fato que as mesmas possuem excelentes propriedades mecânicas, e dessa forma, permitem a manutenção do espaço, facilitando o crescimento de tecido ósseo. Chen C, *et al.*, 2012, realizaram um estudo *in vitro* para observar os efeitos da funcionalização das membranas de PLGA na regeneração óssea guiada, avaliando a proliferação e comportamento de osteoblastos, associando membranas de PLGA a colágeno e quitosana. Os mesmos observaram que as membranas de PLGA contribuíram principalmente com suas propriedades mecânicas. Neste estudo, o grupo PLGA + HA em todos os períodos experimentais, bem como PLGA nos três primeiros, mostraram maiores valores de cinza que o grupo controle. Mesmo com diferenças estatísticas significantes apenas para o grupo PLGA+HA nos períodos de 07 e 15 dias. A manutenção do espaço pelas membranas de PLGA pode favorecer o processo de reparo ósseo em suas fases iniciais.

A busca pelo melhoramento das propriedades físicas e químicas das membranas utilizadas para regeneração tecidual (RTG) e óssea

(ROG) guiadas tem sido constante. Diversos materiais têm sido incorporados às membranas, apresentando resultados satisfatórios tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Chen *et al.*,2012; Reis *et al.*,2011; Hao *et al.*, 2013). No presente estudo os defeitos tratados com membranas de PLGA associadas à HA obtiveram resultados estatisticamente significantes quando comparados com os grupos *Sham* nos dois primeiros períodos testados, além de apresentarem escalas de cinza com valores de média maiores em todos os períodos experimentais. Visto que os defeitos tratados com membranas de PLGA, apesar de obter resultados de escala de cinza maiores que o controle nos três primeiros períodos, esses valores não se mostraram estatisticamente significantes, evidenciando uma possível vantagem da utilização da hidroxiapatita associada à membrana de PLGA. Esta vantagem deve ser comprovada através da análise histomorfométrica, pois, a HA tem certa radiopacidade que pode influenciar os resultados na densitometria óssea. Os variados níveis de reabsorção das membranas nos diversos períodos experimentais testados impedem a padronização dos valores de escala de cinza nas membranas de PLGA+HA.

Sui *et al.*,1997, analisaram *in vitro*, as propriedades da HA associada à membrana de PLLA e observaram uma maior adesão de

osteoblastos à superfície das membranas que foram associadas à hidroxiapatita quando comparadas com as membranas de PLLA isoladas. Desta forma, a hidroxiapatita pode ter o mesmo efeito na associação com as membranas de PLGA. Estudo *in vitro* realizado com células da calvária de ratos observou que arcabouços de PLGA associados à hidroxiapatita possibilitam um aumento na síntese de colágeno, bem como um melhor comportamento dos osteoblastos quando comparados com arcabouços de PLGA sem hidroxiapatita (Messias *et al.*, 2008). Neste estudo, mesmo sem diferença significativa entre os grupos tratados com membranas, os grupos que foram tratados com membranas de PLGA+HA mostraram valores de escala de cinza maiores que os receberam apenas membranas de PLGA.

Nos períodos de 30 e 60 dias, não houve diferença significativa entre os valores dos três grupos testados. A diferença entre os grupos PLGA+HA e *Sham* tornou-se estatisticamente insignificante e o grupo PLGA mesmo sem significância estatística, apresentou valor médio menor que o grupo controle negativo no período de 60 dias, o que pode sugerir que as membranas permitiram um maior do reparo ósseo apenas nas fases iniciais. Hao T *et al.*, 2013, analisaram através de microtomografia e histomorfometria o reparo ósseo em calotas craniana

de ratos, comparando dois tipos de membrana de estrôncio associada à HA, membranas de colágeno e grupo controle negativo. Os mesmos observaram que ocorreu um reparo ósseo mais acelerado na fase inicial dos grupos tratados com membranas de estrôncio associadas à hidroxiapatita.

A associação entre as propriedades mecânicas dos polímeros e as biológicas da HA parece favorecer a proliferação celular nas fases iniciais do reparo ósseo durante a regeneração óssea guiada. Uma análise histomorfométrica pode comprovar os resultados obtidos nesta investigação.

AGRADECIMENTOS

À Genius, divisão de biomateriais da BAUMER S.A, por ceder as amostras utilizadas neste estudo. Ao Prof. Doutor Adair Roberto Soares dos Santos e ao LANDI pela cessão dos laboratórios. À Céfal-X pelas imagens radiográficas. Esta pesquisa foi financiada pela FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos e pelo CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

REFERÊNCIAS

Buser, D., Dula, K., Hirt, H. P. & Schenk R. K. (1996) Lateral Ridge Augmentation Using Autografts and Barrier Membranes: A Clinical Study With 40 Partially Edentulous Patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. **54**.420-432.

Chen, G., Xia, Y., Lu, X., Zhou X, Zhang F & Gu N. (2012) Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*:00A. 000–000.

Chiapasco, M., Casentini, P. & Zaniboni, M. (2009) Bone augmentation procedures in implant dentistry. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* .**24**(SUPPL). 237:259.

Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J. & Nyman, S. (1988) Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic & Reconstructive Surgery*. **81**(5). 672-676, May.

Dahlin, C., Gottlow, J., Linde A. & Nyman S. (1990) Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An

experimental study in monkeys. *Scandinavian Journal Plastic Reconstructive Surgery Hand Surgery*. **24**(1):13-9.

Hao, J., Acharya, A., Chen, K., Chou, J., Kasugai, S. & Lang NP. (2013) Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research* **00**, 1–7.

Ishihara, K., Arai, H., Nakabayashi, N., Morita, S. & Furuya, K. (1992) Adhesive bone cement containing hydroxyapatite particle as bone compatible filler. *Journal of Biomedical Materials Research* **26**:937-944.

Ignatius, A.A. & Claes LX. (1996) In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly (P-L-lactide) and poly (L-lactide-coglycolide). *Biomaterials*. **17**. 631-639.

Karring, T., Nyman, S., Gottlow, J. & Laurell, L. (1993) Development of the biological concept of guided tissue regeneration — animal and human studies. *Periodontology 2000*, **1**. 26–35.

Lopes, M.A., Monteiro, F.J. & Santos, J.D. (1999) Glass-reinforced hydroxyapatite composites: fracture toughness and hardness dependence on microstructural characteristics. *Biomaterials* **20**:20-85.

Melcher, A. H. (1976) On the Repair Potential of Periodontal Tissues. *Journal of Periodontology*. **May, Vol. 47, No. 5**, Pages 256-260, DOI 10.1902/jop.1976.47.5.256.

Messias, A. D., Aragones, A. & Duek, E. A. R. (2009) PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. *Key Engineering Materials* **Vols. 396-398** pp 461-464.

Oh, T. J., Meraw, S. J., Giannobile, W. V. & Wang, H.L. (2003) Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clinical Oral Implants Research* 14, 2003; 80-90.

Owen G R, Jackson J K, Chehroudi B, Brunette D M. & Burt H M. (2010) An in vitro study of plasticized poly(lactic-co-glycolic acid) films as possible guided tissue regeneration membranes: Material properties and drug release kinetics. *Journal of Biomedical Materials Research*. Dec 1; **95 (3)**, 857-69.

Reis, E. C. C., Borges A. P. B., Araújo, M. V. F., Mendes, V. C., Guan L. & Davies J E. (2011) Periodontal regeneration using a bilayered PLGA/calcium phosphate construct. *Biomaterials*. **32**. 9244-9253.

Schmig, J., Wallkamm, B., Hammerler, C.H.F., Gogolewski, S. & Lang NP. (1997) The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clinical Oral Implants Research* **8**. 244-248.

Sui, G., Yang, X., Mei, F., Hu, X., Chen, G., Deng, X. & Ryu, S. (2007) Poly-Llactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, **82A**, (2). 445-454.

Salonen, J.I. & Persson, R.G. (1990) Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. *Journal of Periodontology*. **v. 25, n. 4**. 215-221.

Tatakis, D. N., Promsudthi, A. & Wikesjo, U.M. (1999) Devices for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*. **19**. 59-73.

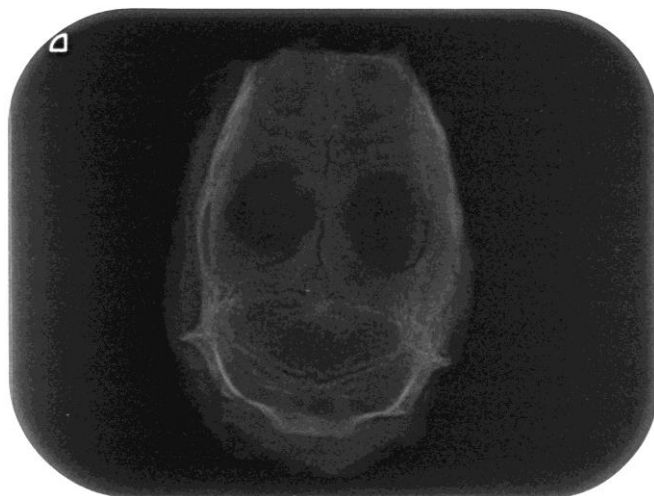
FIGURAS

Figura 1- Radiografia digital da amostra (grupo *sham*). Período experimental de 30 dias pós-operatório.

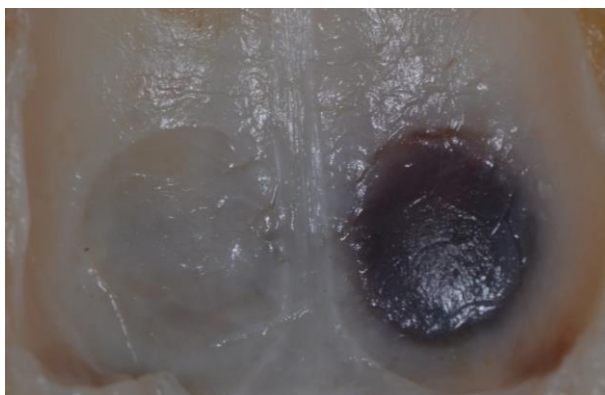


Figura 2- Amostras colhidas no período experimental de 07 dias pós-operatório. Grupos controle (lado esquerdo) e PLGA + HA (lado direito). Notar a presença do coágulo na amostra de PLGA + HA

GRÁFICOS

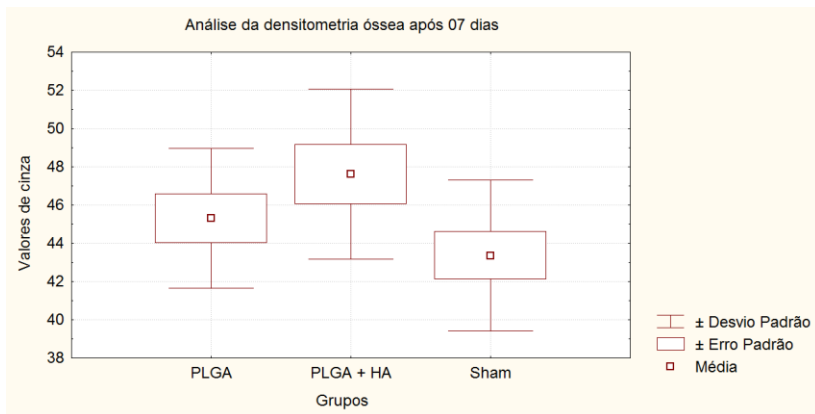


Gráfico 1- Comparação dos valores da escala de cinza entre os grupos PLGA (8 amostras); PLGA+HA (8 amostras) e SHAM (10 amostras) no período experimental de 07 dias pós-operatório. Diferença estatística encontrada a favor do grupo PLGA+HA em relação ao grupo SHAM.

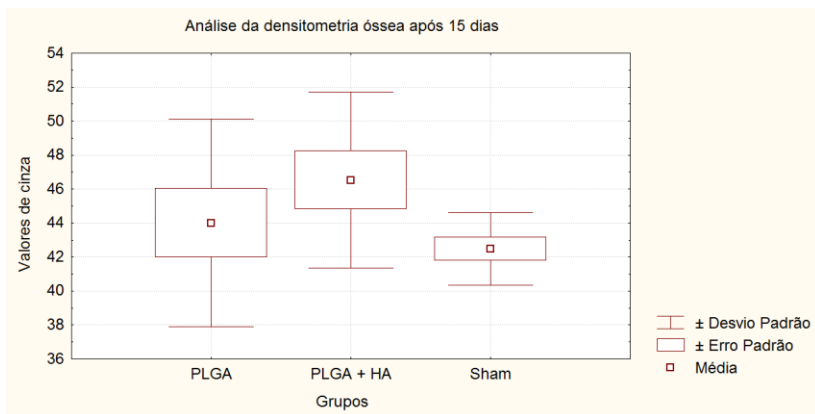


Gráfico 2- Comparação dos valores da escala de cinza entre os grupos PLGA (9 amostras); PLGA+HA (9 amostras) e SHAM (9 amostras) no período experimental de 15 dias pós-operatório. Diferença estatística encontrada a favor do grupo PLGA+HA em relação ao grupo SHAM.

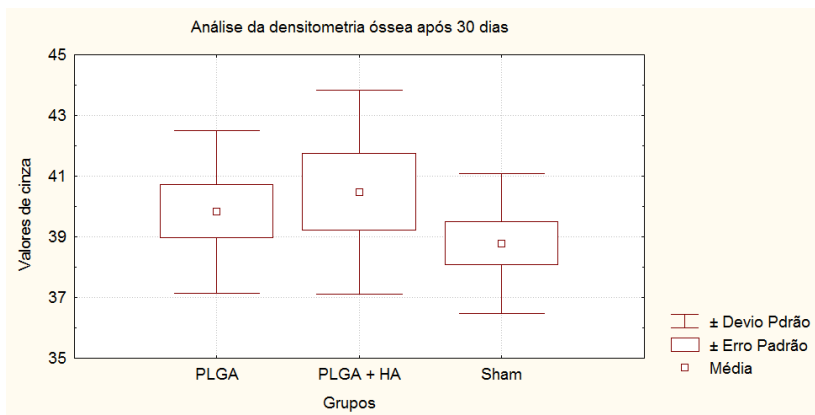


Gráfico 3- Comparação dos valores da escala de cinza entre os grupos PLGA (9 amostras); PLGA+HA (7 amostras) e SHAM (10 amostras) no período experimental de 30 dias pós-operatório. Não houve diferença estatística entre os três grupos.

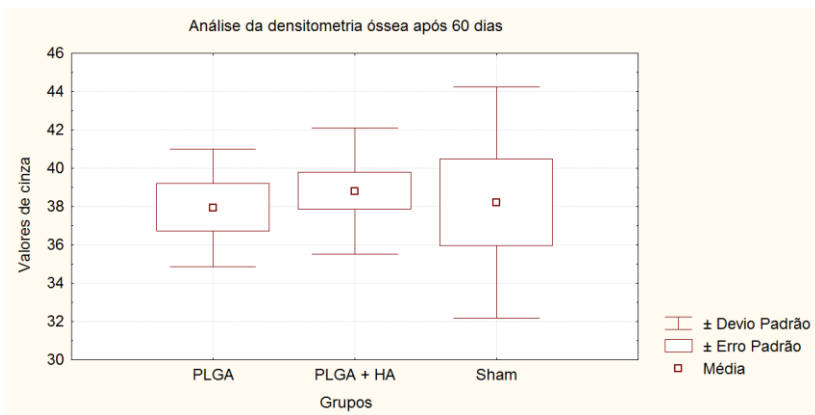


Gráfico 4- Comparação dos valores da escala de cinza entre os grupos PLGA (6 amostras); PLGA+HA (11 amostras) e SHAM (7 amostras) no período experimental de 60 dias pós-operatório. Não houve diferença estatística entre os três grupos.

CAPÍTULO IV

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

BUNYARATAVEJ, P. & WANG, H. L. (2001) Collagen Membranes: A Review Journal of Periodontology. *Journal of Periodontology*. February Vol. 72, No. 2: 215-229.

BENIĆ, G. I., JUNG, R. E., SIEGENTHALER, D. W. & HÄMMERLE, C. H. F. (2009) Clinical and radiographic comparison of implants in regenerated or native bone: 5-year results. *Clinical Oral Implants Research*. 20: 507–513. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01583.x

BUSER, D., DULA, K., HIRT, H. P. & SCHENK, R. K. (1996) Lateral Ridge Augmentation Using Autografts and Barrier Membranes: A Clinical Study With 40 Partially Edentulous Patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 54:420-432.

BUSER, D., BORNSTEIN, M. M., WEBER, H. P., GRÜTTER, L., SCHMID, B. & BELSER, C. (2008) Early Implant Placement With Simultaneous Guided Bone Regeneration Following Single-Tooth Extraction in the Esthetic Zone: A Cross-Sectional, Retrospective Study in 45 Subjects With a 2- to 4-Year Follow-Up. *Journal of Periodontology*. September Vol. 79, No. 9, Pages 1773-1781.

CHEN, G., XIA, Y., LU, X., ZHOU, X., ZHANG, F. & GU, N. (2012) Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research* 2012 Part A:00A:000–000.

CHIAPASCO, M., CASENTINI, P. & ZANIBONI, M. (2009) Bone augmentation procedures in implant dentistry. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 24(SUPPL):237:259.

DAHLIN, C., LINDE, A., GOTTLOW, J. & NYMAN, S. (1988) Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 81(5):672-676, May.

DAHLIN C, GOTTLOW J, LINDE A, NYMAN S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scandinavian Journal Plastic Reconstructive Surgery Hand Surgery*. 1990; 24(1):13-9.

DORAIRAJAN, A., REDDY, RM. & KRIKLER, S. (2005) Outcome of acetabular revision using an uncemented hydroxiapatite-coated component: two- to five-year results and review. *Journal Arthroplasty*. 20:209.

ENCARNAÇÃO, Isis Carvalho. Análise do uso de sinvastatina e arcabouços de PLGA+HA no reparo ósseo de defeitos criados na calota craniana de ratos. Florianópolis, 2012. 143 p. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-Graduação em Odontologia.

GÓMEZ, G., KORKIAKOSKI, S., GONZÁLEZ, M.M., LANSMAN, S., ELLA, V., SALO, T., KELLOMAKI, M., ASHAMMAKHI, N. & ARNAUD, E. (2006) Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer. *Journal Craniofacial Surgery*. 17(5): 935-942.

HAO, J., ACHARYA, A., CHEN, K., CHOU, J., KASUGAI, S. & LANG, N.P. (2013) Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. *Clinical Oral Implant Research* 00, 1–7 doi: 10.1111/clr.12289.

ISHIHARA, K., ARAI, H., NAKABAYASHI, N., MORITA, S. & FURUYA, K. (1992) Adhesive bone cement containing hydroxiapatite particle as bone compatible filler. *Journal of Biomedical Materials Research*. 26:937.

IGNATIUS, A.A & CLAES LX. (1996) In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(P-L-lactide) and poly(L-lactide-coglycolide). *Biomaterials* 17. 631-639.

JUNG, R.E., FENNER, N., HÄMMERLE, C.H.F. & ZITZMANN, N.U.(2012) Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clinical Oral Implant Research*. 1–9

OH, T. J., MERAW, S. J., GIANNOBILE, W. V. & WANG, H.L. (2003) Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. *Clinical Oral Implants Research*. **14**; 80-90.

OWEN, G. R., JACKSON, J. K., CHEHROUDI, B., BRUNETTE, D. M. & BURT, H. M. (2010) An in vitro study of plasticized poly(lactic-co-glycolic acid) films as possible guided tissue regeneration membranes: Material properties and drug release kinetics. *Journal of Biomedical Materials Research*. Dec 1;95(3):857-69. doi: 10.1002/jbm.a.32865.

KARRING, T., NYMAN, S., GOTTLOW, J. & LAURELL, L. (1993) Development of the biological concept of guided tissue regeneration — animal and human studies. *Periodontology* 2000, 1: 26–35. doi: 10.1111/j.1600-0757.1993.tb00204.x

LANSMAN, S., PAAKKO, P., RYHANEN, J., KELLOMAKI, M., WARIS, E., TORMALA, P., WARIS, T. & ASHMMAKHI, N. (2006) Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcuts of experimental design. *Journal Craniofacial Surgery*. 17(6): 1121-1128.

LOPES, M.A., MONTEIRO, F.J. & SANTOS JD. (1999) Glass-reinforced hydroxiapatite composites: fracture toughness and hardness dependence on microstructural characteristics. *Biomaterials*. 20:2085.

LOCCI, P., CALVITTI, M., BELCASTRO, S., PUGLIESE, M., GUERRA, M., MARINUCCI, L., STAFFOLANI N. & BECCHETTI E. (1997) Phenotype Expression of Gingival Fibroblasts Cultured on Membranes Used in Guided Tissue Regeneration. *Journal of Periodontology*. September, Vol. 68, No. 9: 857-863.

MELCHER A. H. (1976) On the Repair Potential of Periodontal Tissues. *Journal of Periodontology*. May, Vol. 47, No. 5, Pages 256-260 , DOI 10.1902/jop.1976.47.5.256.

MESSIAS, A. D., ARAGONES, A. & DUEK, E. A. R. (2009) PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. *Key Engineering Materials*; Vols.396-398 pp 461-464.

NYMAN, S., LINDHE, J., KARRING, T. & RYLANDERH, H. (1982) New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of clinical Periodontology*, Jul; 9(4):290-6,.

OHGUSHI, H., OKUMURA, M., TAMAI, S. & SHORS E.C. (1990) Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research.*, 24, (12):1563-1570.

PEREIRA, S.L.S., SALLUM, A. W., MARCIO Z. CASATI, M.Z. & CAFFESSE, R. G. (2000) Comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in the treatment of dehiscence-type defects. A

histomorphometric study in dogs. *Journal of Periodontology*. Chigago, v. 71, n. 8, p. 1306-14.

PETITE, H. (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotech.* v. 18,n. 9,p. 959-963, Sept.

REIS, E. C. C., BORGES A. P. B., ARAÚJO, M. V. F., MENDES, V. C., GUAN L. & DAVIES J E. (2011) Periodontal regeneration using a bilayered PLGA/calcium phosphate construct.*Biomaterials*. **32**. 9244-9253.

ROTHAMEL, D., SCHWARZ, F., SCULEAN, A., HERTEN, M., SCHERBAUM, W. & BECKER, J. (2004) Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells.*Clinical Oral Implants Research*. 15: 443–449.doi: 10.1111/j.1600-0501.2004.01039.x

SCHLEGEL, A.K., MIJHLER, H., BUSCH, F. & MEHLI, A. (1997) Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). *Biomaterials*. 18 535-538.

SALONEN, J.I. & PERSSON, R.G. (1990) Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. *Journal of Periodontology*. v. 25, n. 4, p. 215-221, Jul.

SCHMIG, J., WALLKAMM, B., HAMMERLER, C.H.F., GOGOLEWSKI, S. & LANG, N.P. (1997) The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clinical Oral Implant Research*. 8:244-248.

SIMION, M., DAHLIN, C., BLAIR, K. & SCHENK, R. (1999) Effect of different microstructures of e-PTFE membranes on bone regeneration and soft tissue response: a histologic study in canine mandible. *Clinical Oral implants Research*. v. 10, n.2, p.73-84, Apr.

SUI, G., YANG, X., MEI, F., HU, X., CHEN, G. & DENG, X. R.U. S. (2007) Poly-Llactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissuregeneration. *Journal of Biomedical Materials Research*. Part A,82A, (2): 445-454.

TATAKIS, D. N., PROMSUDTHI, A. & WIKESJO, U.M. (1999) Devices for periodontal regeneration.*Periodontology 2000*. v. 19, p. 59-73, Feb.

TRIPLETT, R.G., SCHOW, S.R. & FIELDS, R.T. (2001) Bone augmentation with and without biodegradable and non biodegradable microporous membranes. *Journal of Oral&Maxillofacial Surgery*. Clin. Noth Am, v.13, n.3, p.411 -22.

ZITZMANN, N. U., SCHÄRER, P. & MARINELLO, C. P. (2001) Long-term Results of Implants Treated with Guided Bone Regeneration: A 5-year Prospective Study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. May-Jun;16(3):355-66.

CAPÍTULO V

APÊNDICE

FIGURAS DA METODOLOGIA

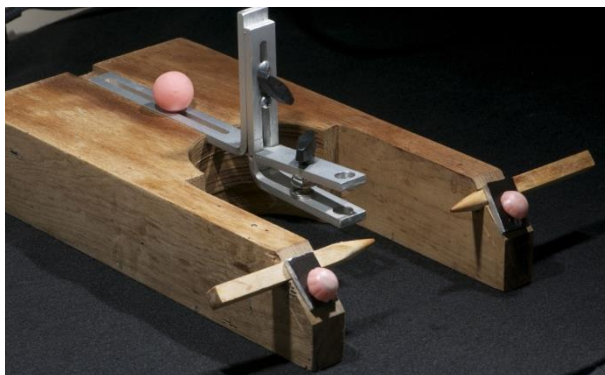


Figura 3- Mesa para estereotaxia



Figura 4- Área operatória preparada assepticamente



Figura 5- Incisão cutânea



Figura 6- Divulsão dos tecidos.



Figura 7-incisão no periósteo



Figura 8- Defeitos realizados nos ossos parietais com trefina de 5mm de diâmetro

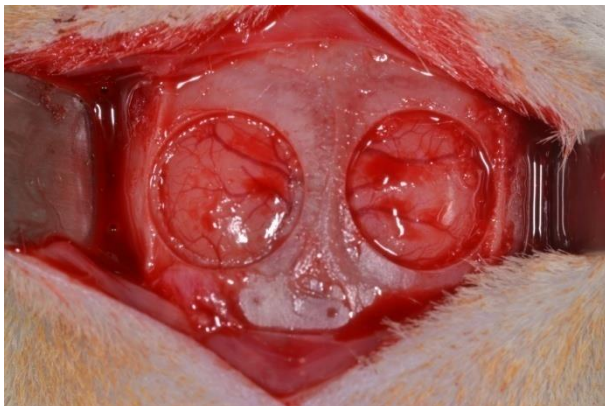


Figura 9- Tecidos ósseos internos à trefina removidos

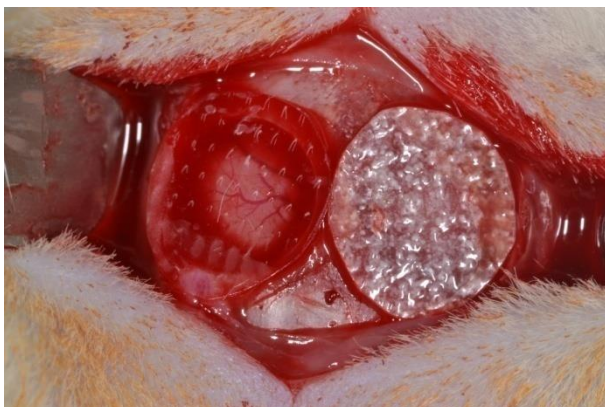


Figura 10- Membranas de PLGA (esquerda) e PLGA +HA (direita) posicionadas sobre os defeitos.

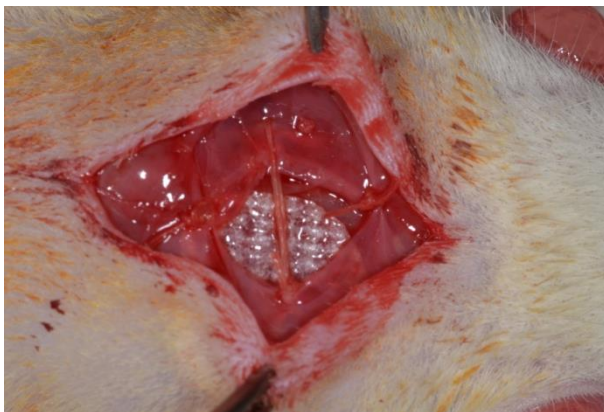


Figura 11- Perióstio suturado estabilizando as membranas



Figura 12- Sutura do tecido cutâneo

ANEXOS

Anexo A- Parecer da Comissão de ética em pesquisa com animais-CEUA

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00831

Título

Análise do padrão de regeneração óssea guiada, utilizando membranas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) associado ou não à hidroxiapatita (PLGA + HA) em defeitos ósseos na calota craniana de ratos.

Data de Entrada

02/05/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

16/08/2013

Considerações

Ofício nº 81/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ricardo de Souza Magini, Departamento de Odontologia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de cinquenta ratos (*Rattus Norvegicus*).

- Procedência do animal: Biotério Central - UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 20/11/2015

Anexo B- Normas do periódico *Clinical Oral Implants Research* para publicação.

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Submission of Manuscripts](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#). **Useful Websites:** [Submission Site](#), [Articles published in *Clinical Oral Implants Research*](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Clinical Oral Implants Research conveys scientific progress in the field of implant dentistry and its related areas to clinicians, teachers and researchers concerned with the application of this information for the benefit of patients in need of oral implants. The journal addresses itself to clinicians, general practitioners, periodontists, oral and maxillofacial surgeons and prosthodontists, as well as to teachers, academicians and scholars involved in the education of professionals and in the scientific promotion of the field of implant dentistry. *Clinical Oral Implants Research* publishes: **Original research articles** of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stoma-tognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation. **Review articles** by experts on

new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. **Case reports** and case series only if they provide or document new fundamental knowledge. **Novel developments** if they provide a technical novelty for any implant system. **Short communications** of important research findings in a concise format and for rapid publication. **Treatment rational** by experts with evidence-based treatment approach. Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Clinical Oral Implants Research*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Clinical Oral Implants Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research. **2.1. Authorship and Acknowledgements** Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. *Clinical Oral Implants Research* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions

1, 2 and 3. Up to 6 authors are accepted without need for justification. In the case of a specific and detailed justification of the role of every author, up to 8 authors may be mentioned. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements. **Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. **2.2. Ethical Approvals** Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version, 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

2.3 Clinical Trials Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements(OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License
OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial –No Derivs
License OAA To preview the terms and conditions of these open
access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley
Author Services
http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit
<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license: Creative Commons Attribution License OAA To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

2.8 OnlineOpen OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author,

the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions,

see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: coir@zmk.unibe.ch

3.1. Getting Started Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
- After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
- Enter a user ID and password of

your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'. • If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password. • Log-in and select Corresponding Author Center. **3.2. Submitting Your Manuscript** • After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar. • Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter. • Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen. • You are required to upload your files. - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer. - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button. - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button. • Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. **3.4. Blinded Review** All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* will be reviewed by two experts in the field. *Clinical Oral Implants Research* uses single blinded review. The

names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper. **3.5. Suggest a Reviewer** *Clinical Oral Implants Research* attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well. **3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process** You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to. **3.7. E-mail Confirmation of Submission** After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our email server (uranus.scholarone.com) to their whitelist. **3.8. Manuscript Status** You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made. **3.9. Submission of Revised Manuscripts** To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of

pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are generally by invitation only and have to be approved by the Editor-in-Chief before submission.

Case reports and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication. **Treatment rational** by experts with evidence-based treatment approach.

Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge Articles exceeding 10 published pages are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent

suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All

services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. In vitro, in vivo, in situ and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., Ps. for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used. **5.2.**

Structure All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Introduction: Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods: Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion: Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies. **Main Text of Short Communications:** Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into material and methods, etc., but should have an abstract. **Acknowledgements:** Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support should be acknowledged. **5.3. References** References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for

example, (Fox et al. 1977). A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be: (i) for journal references: name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers. (ii) for book references: name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

e) The title of the paper should be included, without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised, and followed by volume number in bold type, and page numbers. Examples: Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* **4**: 177-186. Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of erogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. Protein turnover and lysosome function, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here:

www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the

proportions of the printed page. **Figures:** All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend **Preparation of Electronic Figures for Publication:** Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be

forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal. **6.1 Proof Corrections** The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page. **6.2 Early View (Publication Prior to Print)** *Clinical Oral Implants Research* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and

can continue to be used to cite and access the article. **6.3 Author Services** Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including